

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Evaluación de la actividad celulolítica del complejo
enzimático celulasa en cepas fúngicas de los
departamentos de Cajamarca, Lima, Junín, Huánuco**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo – Microbiólogo – Parasitólogo

AUTOR

Henry Frans Llacza Ladera

ASESOR

Pedro Luis Castellanos Sánchez

Lima – Perú

2012

A mis padres y hermanos Nelly, Arturo, Erika y Jhon, por su apoyo incondicional en mi formación profesional.

"La paciencia es un árbol de raíz amarga pero de frutos dulces"

Anonimo

AGRADECIMIENTOS

Nelly y Arturo, por su paciencia y apoyo incondicional en la idea, trabajo y conclusión de este trabajo.

A mis Hermanos Erika y Jhon, por estar siempre en los momentos que más los necesito con sus sabios consejos y levantarme el ánimo.

Al Ph. D. Pedro Castellanos, mi asesor, por guiarme en la realización de este trabajo, su apoyo e infinita paciencia.

Al Dr. Jaime Ortega López, profesor titular del departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN – México por su apoyo en la elaboración de este trabajo.

Compañeros de laboratorio Patty, Margot, Sara, María y Gabriela quienes con su presencia hicieron agradables las largas horas de trabajo.

A mis amigos de siempre, compañeros de la universidad, Chen, Juan Pablo, Wilmer y Efrain.

A mis amigos de toda la vida Oliver, Sergio y Jaqui, por sus palabras de aliento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I.- INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	
2.1 COMPOSICIÓN DE LA CELULOSA	3
2.2 COMPLEJO ENZIMÁTICO CELULASA	9
2.2.1 Endoglucanasas	10
2.2.2 Exoglucanasas	11
2.2.3 Beta glucosidasa	11
2.3 RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN DE LAS CELULASAS	13
2.4 MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS	14
III. HIPÓTESIS	
IV. OBJETIVOS.	
V. MATERIAL Y MÉTODOS.	
5.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS	20
5.2 EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO CELULASA	20
5.2.1 Selección de cepas por el método de difusión radial en agar czapeck-CMC	21
5.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	21

5.4 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO CELULASA	
5.4.1 Preparación del inóculo.	21
5.4.2 Ajuste de la concentración del inóculo.	22
5.4.3 Inducción del complejo enzimático celulasa	22
5.4.4 Evaluación de la actividad celulolítica del complejo enzimático extracelular	23
VI. RESULTADOS	
6.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS FUNGICAS	24
6.2 SELECCIÓN DE CEPAS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN RADIAL EN AGAR CZAPECK-CMC	
6.2.1 Primera etapa.	24
6.2.2 Segunda etapa	25
6.2.3 Tercera etapa	25
6.2.4 selección de cepas fúngicas productoras de celulasas extracelulares	26
6.3 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	26
6.5 EVALUACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL COMPLEJO CELULASA	27

VII. DISCUSIÓN.

7.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS	35
7.2 SELECCIÓN DE CEPAS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN RADIAL EN AGAR CZAPECK-CMC	36
7.3 CEPAS FÚNGICAS SELECCIONADAS	38
7.4 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL COMPLEJO CELULASA	38
VIII. CONCLUSIONES	40
IX. RECOMENDACIONES	41
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	42
XI. ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1:	8
Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos lignocelulósicos (Cuervo <i>et al.</i> , 2009).	
Tabla 2:	14
Grupos de organismos degradadores de celulosa	
Tabla 3:	27
Reactivación de cepas fúngicas según el lugar muestreado.	
Tabla 4:	27
Áreas de hidrólisis en carboximetilcelulosa producidas por los hongos en las tres etapas de evaluación semicuantitativa.	
Tabla 5:	28
Cepas fúngicas seleccionadas por lugar de muestreo en las tres etapas de evaluación semicuantitativa.	
Tabla 6:	28
Total de cepas de hongos seleccionadas en las tres etapas de evaluación semicuantitativa.	
Tabla 7:	29
Promedio de las cepas de hongos seleccionadas en la tercera etapa durante la evaluación semicuantitativa.	

Tabla 8:

29

Las 5 mejores cepas de hongos productoras de celulasas en las 3 etapas evaluación semicuantitativa.

Tabla 9:

30

Evaluación de la actividad enzimática en UI de las cepas fúngicas por el método cuantitativo.

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1:	3
Cadena lineal de glucosa con los enlaces beta 1- 4 en forma de cinta aplanadas con los grupos OH sobresaliendo lateralmente (Patrouilleau <i>et al.</i> , 2007).	
Figura 2:	4
Unión de las moléculas de glucosa a través de puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals (Marquina, 1991)	
Figura 3:	4
Malla cristalina “micela” de la celulosa.	
Figura 4:	5
Agrupación de las cadenas de celulosa para dar lugar a micelas, micro-fibrillas y fibras de celulosa (Marquina, 1991).	
Figura 5:	6
Disposición de la celulosa cristalina y amorfa en una fibra vegetal.	
Figura 6:	7
Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas (Cuervo et al., 2009).	
Figura 7:	9
Mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa según el modelo de Reese	
Figura 8.	10
Modelo de la regulación de la síntesis en <i>T. reesei</i> 1) Celulasas constitutivas. 2) β -glucosidasa unida a la membrana. 3) β -disacáridopermeasa; CBL 1,5 celobionolactona (Macarron, 1992).	

Figura 9:	12
Modelos del mecanismo de hidrólisis enzimática de celulosa. A) Modelo de Montenecourt. B) Modelo de Coughlan. 1.- Celobiosa oxidasa/deshidrogenasa; 2.- Lactonasa. 3.- β -glucosidasa 4.- Endoglucanasas 5.- Celobiohidrolasa 6.- Glucosa oxidasa (Macarron, 1992).	
Figura 10:	13
Modelo de estructura tridimensional de una enzima celulolítica de <i>T. reesei</i> . Se señala el punto de ataque proteolítico por papaína en CBH I y CBH II (Macarron, 1992).	
Figura 11:	17
La figura muestra la presencia del micelio y la hidrólisis producida por la acción del complejo enzimático celulasa extracelular. El hongo fue sembrado por puntura en la parte media de la placa	
R_{mayor} : Radio mayor; r_{menor} : Radio menor.	
Figura 12:	30
Comportamiento de las 260 cepas fúngicas en la primera selección con respecto a su frecuencia y su área (10^2mm^2). La línea roja indica valor mínimo de selección ($5.6 \times 10^2 \text{ mm}^2$).	
Figura 13:	31
Comportamiento de las 78 cepas fúngicas en la segunda selección con respecto a su frecuencia y su área (10^2mm^2). La línea roja indica valor mínimo de selección ($8.7 \times 10^2 \text{ mm}^2$).	
Figura 14:	31
Comportamiento de las 29 cepas fúngicas en la tercera selección con respecto a su frecuencia y su área (10^2mm^2). La línea roja indica valor mínimo de selección ($9.5 \times 10^2 \text{ mm}^2$).	

Figura 15:	32
<i>Paecilomyces sp cepa SA-726: Características macroscópicas (A)</i>	
<i>y microscópicas (B) (A) colonia (placa) (B) microcultivo (lamina).</i>	
Figura 16:	32
<i>Paecilomyces sp cepa SA-651 Características macroscópicas (A)</i>	
<i>y microscópicas (B) (A) colonia (placa) y (B) microcultivo (lamina)</i>	
Figura 17:	33
<i>Paecilomyces sp cepa SA-668 características macroscópicas (A)</i>	
<i>y microscópicas (B). (A) colonia (placa) y (B) microcultivo (lamina).</i>	
Figura 18:	33
<i>Fusarium sp cepa SA-683 Características macroscópicas (A)</i>	
<i>y microscópicas (B). (A) colonia (placa) y (B) microcultivo (lamina).</i>	
Figura 19:	34
<i>Aspergillus sp cepa HN-566 características macroscópicas (A)</i>	
<i>y microscópicas (B). (A) colonia (placa) y (B) microcultivo (lamina).</i>	
Figura 20:	49
Crecimiento fúngico después de 5 días en incubación	
agitada, en czapeck-CMC	
Figura 21:	49
Crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> SA – 683 (Izquierda) y <i>Paecilomyces sp</i>	
(SA – 726) (Derecha) en la preparación de inóculo.	
Figura 22:	50
Crecimiento fúngico después de 5 días en incubación agitada,	
en czapeck-CMC.	

RESUMEN

Mundialmente los residuos lignocelulósicos constituyen el recurso renovable más importante que existen y está compuesto en su mayor parte por celulosa la que es degradada principalmente por hongos. En el Perú se conoce poco acerca del potencial celulolítico de las cepas fúngicas nativas en las distintas regiones de nuestro país. Este trabajo tuvo como objetivo seleccionar cepas fúngicas productoras de celulasas de los mantenidos en el cepario del laboratorio de micología aplicada, identificarlas morfológicamente y evaluar su actividad enzimática. Se evaluaron 289 cepas semicuantitativamente mediante la técnica de difusión radial en agar czapeck Na-CMC y cuantitativamente por el método de Somogy Nelson. Se seleccionaron cinco cepas: tres del genero *Paecilomyces sp* (SA – 726; SA - 668; SA – 651), una de *Fusarium sp* (SA - 683) y una de *Aspergillus sp* HN – 566), los que presentaron áreas de hidrólisis de 14.9; 12.5, 12.0, 14.4 y 12.7 x 10² mm² respectivamente. La actividad enzimática de las cepas seleccionadas mostró los siguientes valores: 0.048, 0.042, 0.042, 0.080 y 0.048 UI/mL respectivamente. Los resultados muestran que existen cepas nativas en las zonas de Satipo y Huancayo con buena actividad enzimática, las cuales tienen un alto potencial para la producción o la investigación.

Palabras claves: Celulasas, Czapeck, difusión radial, Somogy Nelson, actividad enzimática.

SUMMARY

Lignocellulosic residues are the largest renewable resource that exists in the world, for the most part composed of cellulose and is degraded mainly by fungi. In the Peru, little is known about the cellulolytic potential of native fungal strains in the different regions of our country.

The objective of this work was to make a selection of cellulolytic fungal strains, identify them morphologically, and evaluate their enzymatic activity. Two hundred and eighty-nine strains were reactivated and evaluate semi quantitatively and qualitatively by the radial diffusion technique in czapeck agar Na-CMC and Nelson-Somogy method respectively. Five strains were selected: from sort *Paecilomyces sp* (SA-726; SA-668; SA-651) a *Fusarium sp* (SA-683) and an *Aspergillus sp* (HN-566), with hydrolysis of 14.9; 12.5; 12.0; 14.4 and 12.7x10² mM². Enzyme activity was evaluated revealing the following values: 0.048, 0.042, 0.080, and 0.048 UI/mL, respectively. Results show that exist native strains with good enzymatic activity which have high potential for production and investigation.

Key words: celulasas, czapeck, radial diffusion, Nelson-Somogy, enzymatic activity

I.- INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, constituido principalmente por celulosa (Singh y Hayashi, 1995). Los residuos lignocelulósicos generados en parques, campos agrícolas, bosques y agroindustrias, tienen poca utilidad por ser material de desecho, su acumulación genera problemas de contaminación visual, plagas y olores afectando la calidad de vida de las personas.

La descomposición de la celulosa se da naturalmente por microorganismos como: protozoarios, bacterias y hongos. Los hongos tienen la facilidad de colonizar rápidamente el sustrato produciendo diferentes complejos enzimáticos, entre ellos el complejo enzimático celulasa, que intervienen en la descomposición de la celulosa, constituido principalmente por tres tipos de enzima; endoglucanasas, exoglucanasas y beta-glucosidasas; estas actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa liberando moléculas de glucosa (Hernández *et al.*, 1999).

Los residuos lignocelulósicos son de interés por estar constituidos principalmente por polímeros de glucosa y en menor grado de lignina, hemicelulosa entre otros. Al obtener unidades de glucosa provenientes de los residuos celulósicos, estas pueden ser transformados por las levaduras a etanol y pueden ser aprovechados como fuente de energía (Patrouilleau *et al.*, 2007).

Las celulasas pueden ser empleadas en diferentes industrias como alimentos, textiles, papel, con la finalidad obtener un producto con mejores propiedades y características, aumentando su valor agregado, reduciendo los costos y sin contaminar el ambiente (Chacón y Waliszewski., 2005).

El complejo enzimático celulasa más estudiado pertenece a *Trichoderma reesei*, del cual se ha logrado conocer ampliamente sus componentes, estructura molecular y aumentar la actividad enzimática (Irwin *et al.*, 1998; Mejía *et al.*, 2007). En nuestro país se ha generado conocimiento en el tema pero de manera aislada, aportando poco conocimiento sobre el potencial de nuestras cepas nativas; por lo que este trabajo proporciona información al haber realizado una selección de cinco lugares, en cuatro departamentos del país y seleccionando los hongos que presentaron la mejor capacidad de producir enzimas para su empleo en producción o investigación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 COMPOSICIÓN DE LA CELULOSA

La celulosa es un hidrato de carbono que está compuesta por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídico beta (1-4), cada monómero de glucosa tiene una rotación de 180 grados, es estabilizada por la formación de enlaces intermoleculares y puente de hidrogeno. El conjunto de uniones de monómeros de glucosa (conformación en silla, la más estable en la naturaleza) dan origen a cadenas lineales en forma de cinta aplanadas con los grupos OH sobresaliendo lateralmente (Figura 1), formando así un polímero no ramificado de aproximadamente 2000 a 2500 unidades de glucosa, sin embargo la longitud varía de acuerdo al tipo de organismo (Patrouilleau *et al.*, 2007).

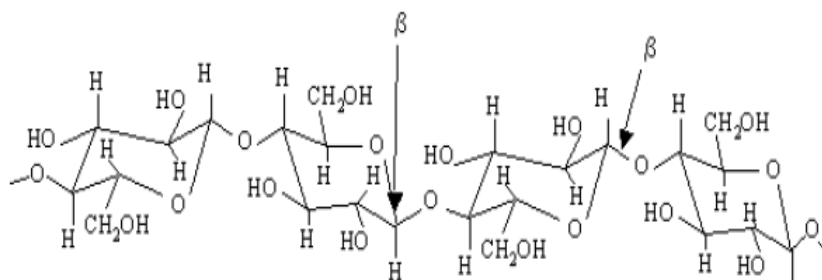


Figura 1.- Cadena lineal de glucosa con los enlaces beta (1-4) en forma de cinta aplanadas con los grupos OH sobresaliendo lateralmente (Patrouilleau *et al.*, 2007).

Las cadenas lineales en forma de cintas aplanadas de la celulosa se unen por medio de enlaces puente hidrógeno y fuerzas de Vander Waals, (Figura 2) estos le dan a la celulosa la propiedad de rigidez impidiendo la flexión entre moléculas formando así una agregación con alto grado de ordenamiento en forma de una malla cristalina, la cual impide el ataque enzimático, al conjunto de mallas cristalinas se les denomina “micelas”, ver Figura 3 (Marquina, 1991).

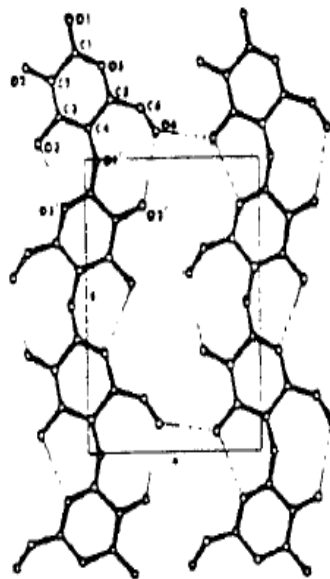


Figura 2: Unión de las moléculas de glucosa a través de puentes de hidrogeno y fuerzas de Vanderwaals (Marquina, 1991).

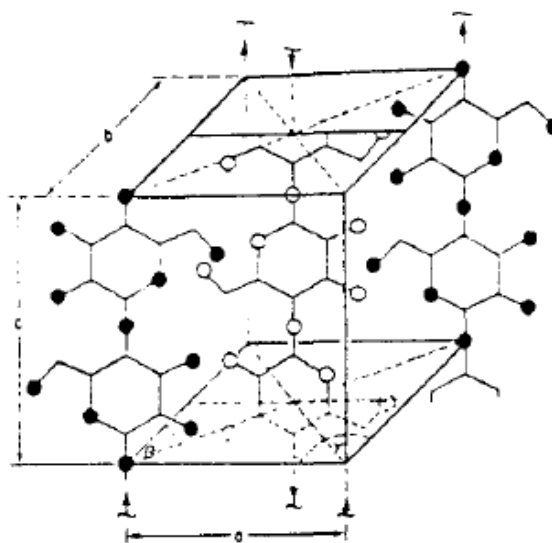


Figura 3: Malla cristalina “micela” de la celulosa.

Las micelas por su alto grado de polimerización y ordenamiento (cristalinidad) resulta ser insoluble en agua. El conjunto de micelas llegan a formar una micro fibrilla de celulosa (20 unidades de micelas), el conjunto de ésta, la fibra de celulosa (250 unid. de micro fibrillas), las cuales son visibles a microscopia óptica y la unión de 1500 fibras forman las macro fibras de celulosa observadas a simple vista (Figura 4). Sin embargo, existen espacios relativamente pequeños entre las micelas que no presentan enlaces con el puente de hidrogeno; las moléculas se encuentran de forma desordenada y se les denominada celulosa amorfa, estas regiones de la celulosa son solubles en comparación con el alto grado de ordenamiento de la celulosa cristalina (Figura, 5). Estos espacios de celulosa amorfa según el análisis de difracción de rayos x corresponden a un 5% de la celulosa total.

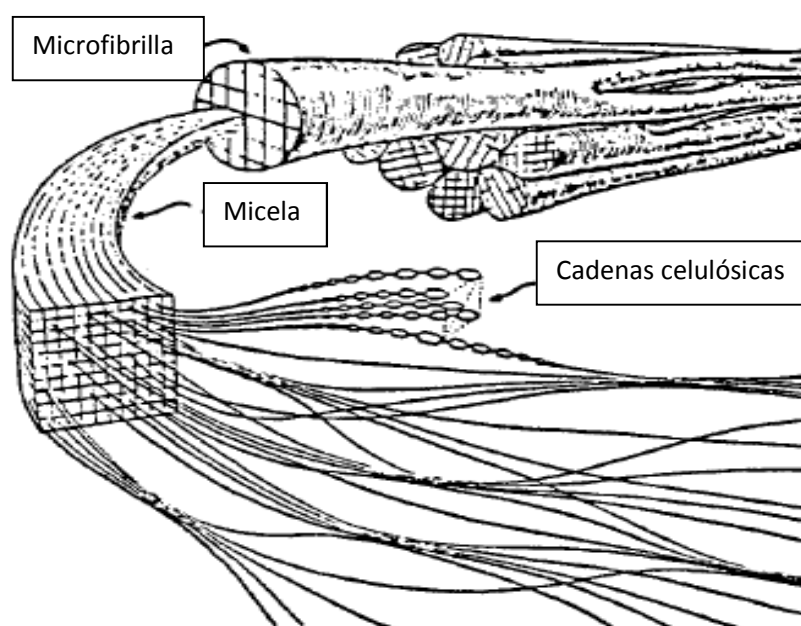


Figura 4: Agrupación de las cadenas de celulosa para dar lugar a micelas, micro-fibrillas y fibras de celulosa (Marquina, 1991).

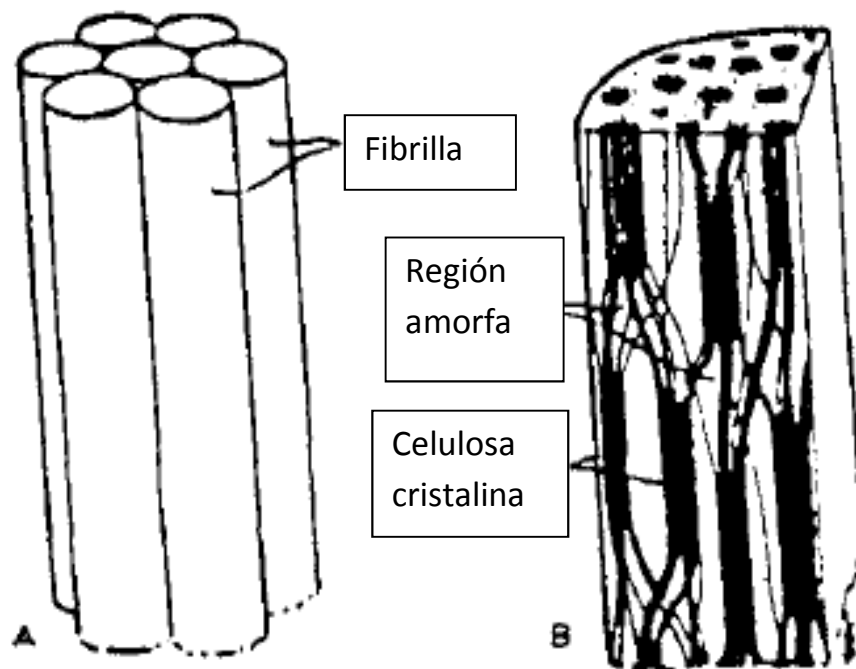


Figura 5: Disposición de la celulosa cristalina y amorfa en una fibra vegetal.

En la mayoría de casos la celulosa no se encuentra sola si no entrecruzada en una matriz amorfa de lignina y hemicelulosa (Figura 6), al conjunto de estas tres moléculas se le denomina lignocelulosa, constituyen parte estructural de la célula vegetal. La proporción en general de las moléculas que constituyen la lignocelulosa son de: 35-40% para celulosa, 15-35% de lignina y 20-40% hemicelulosa.

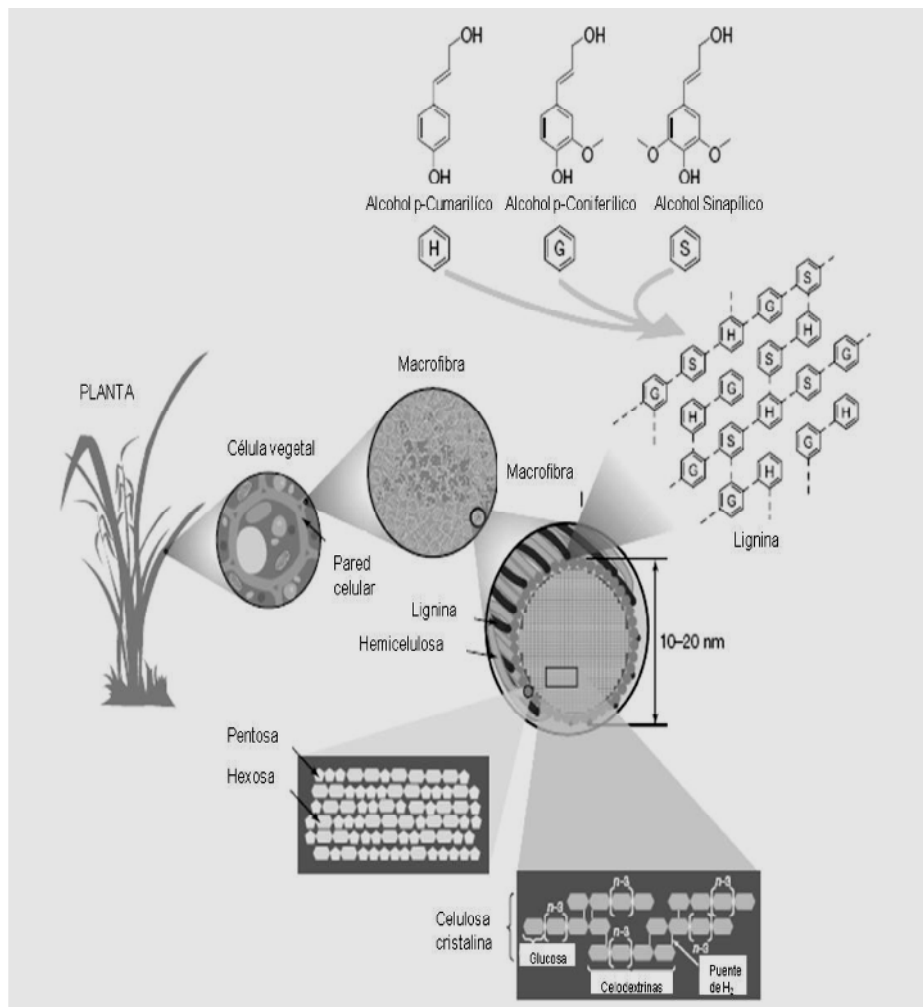


Figura 6: Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas (Cuervo *et al.*, 2009).

La composición y porcentaje de los polímeros varía de acuerdo a las especies de plantas, edad y etapa de crecimiento, en el caso de los residuos lignocelulósicos el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina se muestra en la Tabla 1 (Cuervo *et al.*, 2009).

Tabla 1: Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos lignocelulósicos (Cuervo *et al.*, 2009).

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND	24-29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba Bermuda	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12

ND: No Disponible

La biomasa lignocelulósica tiene una velocidad de síntesis de 4×10^7 - 4×10^{10} TM/año, de esta manera logra ser el polímero más abundante en la biosfera, cuya esencia es la fotosíntesis (Singh y Hayashi, 1995).

2.2 COMPLEJO ENZIMÁTICO CELULASA

La celulosa es degradada por la acción sinérgica de tres enzimas que constituyen el complejo enzimático celulasa, a continuación se describe su acción de acuerdo al complejo celulolítico de *Trichoderma reesei*:

CELULOSA $\xrightarrow{-C_1-}$ CELULOSA ACTIVADA $\xrightarrow{-C_x-}$ CELOBIOSA $\xrightarrow{-\beta\text{-glucosidasa}}$ GLUCOSA

Figura 7. Mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa según el modelo de Reese.

Para iniciar la degradación de celulosa insoluble existen celulasas adheridas a las hifas y conidios del hongo, como las β -glucosidasas constitutivas ligadas a las membranas plasmáticas quienes por actividad transglucosilasa sobre los oligómeros presentes forman celobiososa, inductor de las celulasas, que también se puede formar en el medio extracelular por la acción de las endoglucanasas (EG). La regulación de la entrada de inductores es llevada a cabo por la β -disacárido-permeasa localizado en la pared del hongo, la regulación de la síntesis del complejo celulasa tiene lugar en la transcripción ver figura 8 (Macarron, 1992).

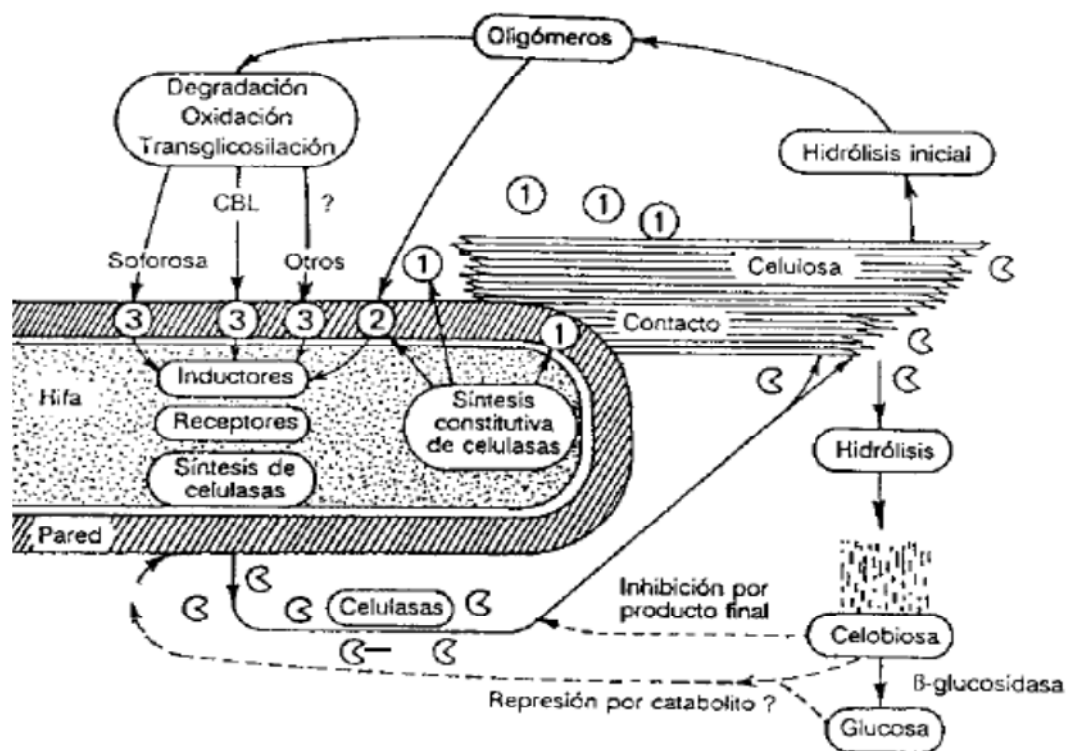


Figura 8: Modelo de la regulación de la síntesis en *T. reesei*. 1) Celulasas constitutivas 2) β -glucosidasa unida a la membrana. 3) β -disacárido-permeasa; CBL 1,5 celobionolactona (Macarron, 1992).

2.2.1 ENDOGLUCANASAS

Se han descrito tres formas de endoglucanasa (EG) (1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas): EG1, EG2, EG3, la que actúa de forma aleatoria sobre los enlaces β (1,4)-glucosídico, presentes en las regiones amorfas de la celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, lo cual provoca la disminución del grado de polimerización de la celulosa, la creación de nuevos extremos no reductores, que sirven de sustrato para la posterior acción de exoglucanasas y el lento incremento de azúcares reductores como; glucosa, celobiosa (=disacárido) y celotriosa (=trisacáridos) (Chacón y Waliszewski, 2005).

Los sustratos comúnmente utilizados para el estudio de las endoglucanasas son carboximetilcelulosa y celulosa amorfa tratada con H_3PO_4 o álcali, su acción se caracteriza por la disminución de la viscosidad como consecuencia de los clivajes intermoleculares. Mientras que la celulosa cristalina como las fibras de algodón o el avicel son atacadas de manera lenta por esta enzima (Hernández *et al.*, 1999).

2.2.2 EXOGLUCANASAS

Exoglucanasas (exo- β -1,4-glucanasa) o celobiohidrolasas (CBH), en *Trichoderma reesei* se distinguen dos: CBH1, CBH2. Ha sido denominada por Reese como “sistema C1”, que se caracteriza por cortar las molécula de celulosa y de las celodextrinas en los enlaces β (1,4) -D glucano a partir del extremo no reductor; lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa (Marquina, 1991). La acción de las exoglucanasas se realiza mediante una adsorción y formación del complejo enzima-sustrato, seguida de la formación del producto (Ladisich *et al.*, 1983).

2.2.3 BETA GLUCOSIDASAS

Después de la degradación de las zonas amorfas de la celulosa y la hidrólisis de la región cristalina, por la acción sinérgica de la endoglucanasas y las exoglucanasas. Actúan finalmente las β (1,4) glucosidasas (celobiasa - Cb), quienes degradan la celobiosa, celodextrinas a celobiosa o glucosa respectivamente, como consecuencia producen la inhibición de las endoglucanasas y exoglucanasas (Chacón y WaliszewskiK, 2005). La beta glucosidasa supone el 1% de toda la proteína enzimática del complejo celulolítico de *T. reesei*, mientras que la endoglucanasa supone el 30% y la exoglucanasa 69%. Con la finalidad de describir la acción del complejo enzimático celulasa se han desarrollado modelos de acción del complejo celulolítico de *T. reesei*, ver figura 9 (Marquina, 1991).

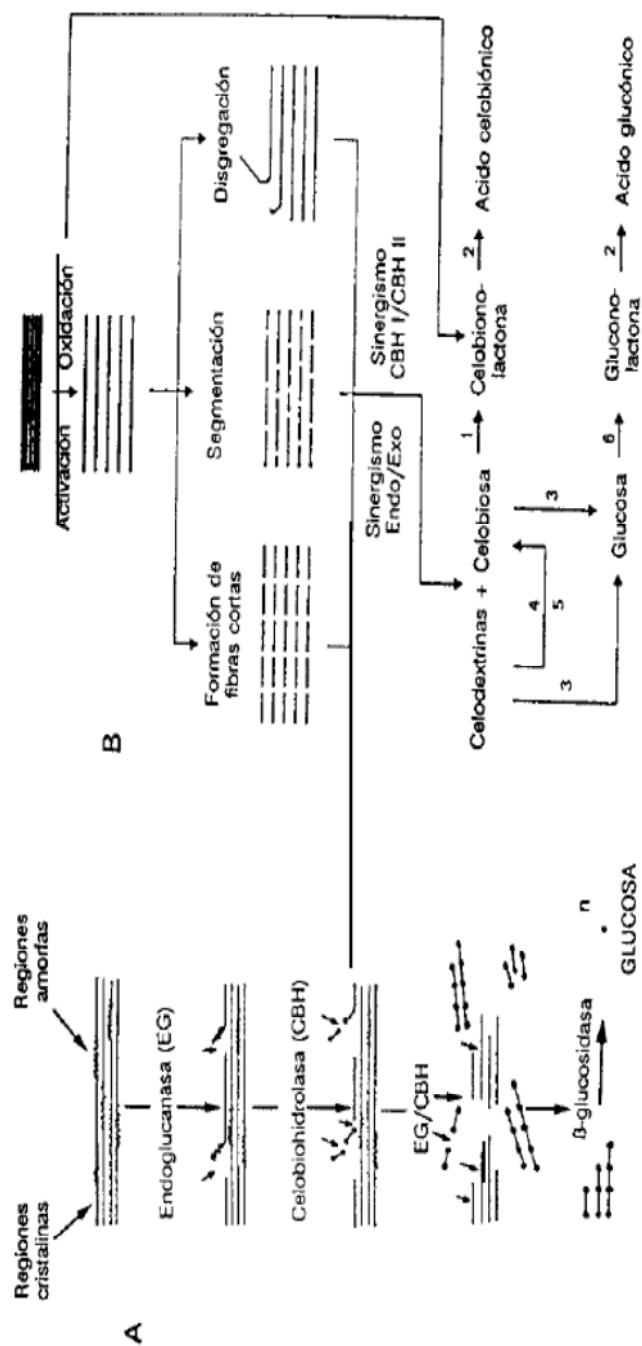


Figura 9: Modelos del mecanismo de hidrólisis enzimática de celulosa. A) Modelo de Montencourt. B) Modelo de Coughlan. 1.- Celobiosa oxidasa/deshidrogenasa; 2.- Lactonasa. 3.- β-glucosidasa 4.- Endoglucanasa 5.- celobiohidrolasa 6.- Glucosa oxidasa (Macarron, 1992).

2.3. RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN DE LAS CELULASAS

Las principales celulasas de *T. reesei* como son las endoglucanasas (EG), y las celobiohidrolasas (CBH) comparten una arquitectura en común; en un extremo se encuentra el dominio o núcleo catalítico donde se localiza el centro activo, en el otro extremo de la proteína consiste en un dominio de unión a la celulosa y ambos dominios se encuentran unidos por una bisagra glicosilada. Los dominios o núcleos catalíticos comprenden la mayor parte de cada celulasa de *T. reesei*, comprenden unos 300 aminoácidos. Los dominios catalíticos pueden actuar independientemente conservando intacta su capacidad para hidrolizar sustratos solubles, en cambio disminuye drásticamente sobre celulosa nativa por lo que se deduce que el núcleo contiene el centro activo de la enzima pero no el sitio de unión a la celulosa (Figura 10) (Macarron, 1992).

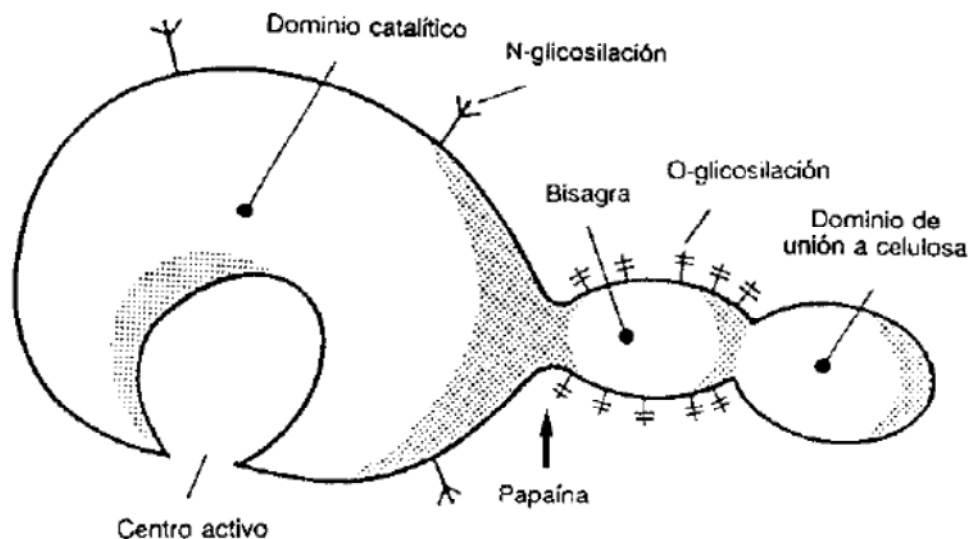


Figura 10: Modelo de estructura tridimensional de una enzima celulolítica de *T. reesei*.

Se señala el punto de ataque proteolítico por papaína en CBH I y CBH II

2.4 MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

En la degradación de la celulosa intervienen diferentes microorganismos que habitan en la naturaleza y actúan a diferentes de temperatura y concentración de oxígeno, pudiendo ser: bacterias (*Cellulomonas sp*, *Clostridium thermocellum sp*, *Ruminococcus albus*), actinomicetos (*Streptomyces sp*, *Thermomonospora curvulata*) y hongos (*Aspergillus niger*, *Penicillium spp*, y *Trichoderma sp*) (Tabla 2). El género *Trichoderma* presenta las celulasas más activas que logra degradar la celulosa hasta unidades de D-glucosa (Marquina, 1991).

Tabla 2: Grupos de organismos degradadores de celulosa

GRUPO	ESPECIE
Hongos aeróbicos	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Talaromyces</i> y <i>Trichoderma koningii</i>
Hongos aeróbicos termófilos	<i>Sporotrichum Thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> , <i>Humicola insolens</i>
Hongos anaeróbicos mesófilos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> .
Bacterias aerobias mesófilas y termófilas	<i>Cellulomonas sp.</i> , <i>cellvibrio sp.</i> , <i>Microbispora bispora</i> y <i>Thermomonospora sp.</i>
Bacterias anaerobias mesófilas y termófilas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> y <i>Clostridium thermocellum</i>

Los hongos conforman un grupo muy numeroso aproximadamente entre 1 y 1.5 millones de especies; presentan una amplia distribución en la naturaleza participando activamente en la degradación y reciclamiento de materia orgánica pueden usar prácticamente cualquier compuesto orgánico transformándolo en energía. Por ser organismos heterotróficos necesitan materia orgánica para su metabolismo por lo que cuenta con complejos enzimáticos para degradar moléculas complejas a más sencillas, así difundirlas a través de la pared celular y aprovecharlas (Deacon, 1990).

El material lignocelulósico es susceptible de ser degradado siguiendo un ciclo trófico que empieza por las bacterias, mohos, ascomicetos y basidiomicetos. Las bacterias por si mismas no lo alteran de forma significativa, pero mediante su acción permite la entrada de otros organismos como son los hongos; principales causantes de la degradación de material lignocelulósico. La colonización e invasión de éstos comienza con la entrada de las hifas en los canales naturales de las células leñosas y puede ser de dos formas: la penetración pasiva, que se realiza mecánicamente donde las hifas van colonizando las traqueidas y lúmenes de las células leñosas atravesando de una célula a otra, y la penetración activa que viene acompañada de una actividad enzimática. La duración de cada una de las fases es dependiente del tipo de hongo y de las condiciones de desarrollo. Las condiciones para un buen desarrollo del hongo están sujetas a factores fisicoquímicos como la humedad que debe de estar en un nivel superior al 20%, temperatura que debe de estar entre 20 a 30 °C, el pH ácido entre 4.5 a 5.5 dependiendo de las especies, por último la luz es otro factor que influye de manera distinta en los hongos en algunos los inhibe en otros es importante para su fructificación (Troya y García,2000).

El estudio de los hongos capaces de degradar la celulosa, por la acción de complejos enzimáticos, es de interés debido a la producción de compuestos útiles, a partir productos o desechos de origen vegetal. Actualmente se sigue en la búsqueda de cepas fúngicas con altos valores de degradación, encontrando diferentes géneros como: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Acremonium* y por último el más estudiado *Trichoderma* (Hao *et al.*, 2005; Jalil y Omar, 1998;). Los lugares de aislamiento son diversos entre los más representativos tenemos suelo, compost, bosques, estiércol, entre otros (Chinedu *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2009; Ramírez y Cocha, 2003). La necesidad de poder evaluar la capacidad celulolítica de las cepas que se aíslan ha llevado a idear diferentes métodos cualitativos y cuantitativos, entre los cualitativos tenemos:

- 1.- Pérdida de peso del sustrato insoluble.
- 2.- Disminución de las propiedades mecánicas de fibras o films.
- 3.- Cambio de la turbidez de la celulosa en suspensión.
- 4.- Disminución de la viscosidad de derivados de celulosa.
- 5.-Medición de zonas claras en agar celulosa.
- 6.- Observaciones microscópicas de cambios morfológicos en sustratos de celulosa (fibra, cellofan) (Saddler, 1982; Ghose, 1987).

Entre estas, la técnica de difusión radial en agar con medio mínimo mineral czapeck empleando Na-carboximetilcelulosa, proporciona valores semicuantitativos Zhang *et al*, 2006, pero es comúnmente empleada cualitativamente en aislamiento primario y la identificación de microorganismos celulíticos, donde se pueden apreciar zonas de aclaramiento, por la presencia de enzimas (Figura 11) (Hankin L. y Anagnostakis S. 1977; Hendricks *et al.*, 199).

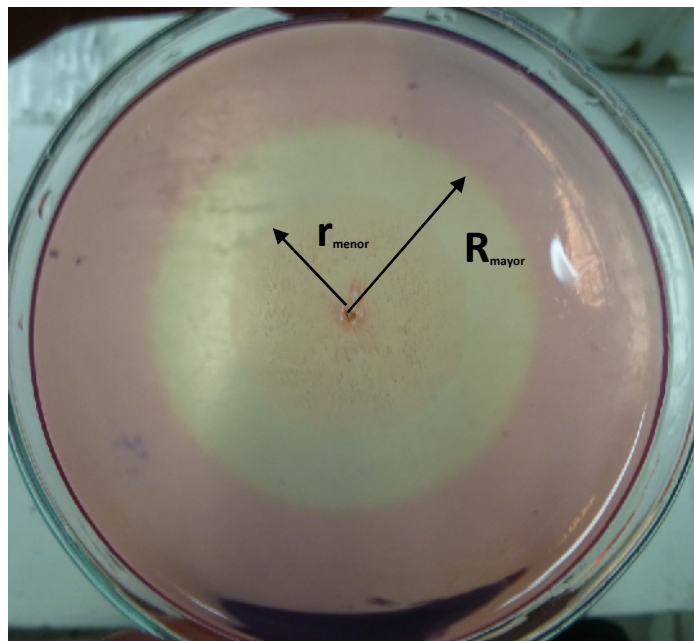


Figura 11:

La figura muestra la presencia del micelio y la hidrólisis producida por la acción del complejo enzimático celulasa extracelular. El hongo fue sembrado por puntura en la parte media de la placa. R_{mayor} : Radio mayor; r_{menor} : Radio menor

El método se basa en la capacidad del colorante rojo de congo de adherirse a la Na-carboximetilcelulosa tornándose la placa petri de color rojo, al ser degradada la Na-carboximetilcelulosa por el complejo enzimático celulasa; el área hidrolizada toma un color amarillo lo cual indica que el colorante no se pudo adherir al polímero, que se ha sido disgregado ver figura 11 (Kasana *et al.*, 2008).

Para conocer la capacidad óptima síntesis enzimática se evalúa las variables que influyen en el hongo, como la concentración de inóculo (conidios/mL), fuente de carbono (avicel, algodón, Na-CMC), fuente de nitrógeno (asparagina, urea, glicina, etc.), surfactante (tween 80, tergitol, etc), pH (4 a 5), temperatura (20 a 30°C), presencia de inductores e inhibidores, aireación (cultivos con aireación son más eficientes), tiempo de desarrollo (5 a 20 días), soportes de crecimiento (inmovilización de esporas), cultivos mixtos (dos o más cepas en el cultivo), entre otros (Muñiz, 1993; Castillo, 1994; Dueñas, 1995).

Actualmente se busca cepas que presenten buena capacidad de producir enzimas celulolíticas en diferentes lugares, haciendo aislamiento y seleccionando, con la finalidad de emplearlas en distintas áreas de la industria como la energética (bioetanol), de alimentos (extracción de jugos, almidón, aceites, colorantes), papel y enriquecimiento de forraje entre otras aplicaciones (Golovloev y Scriabin 1984; Garcia *et al.*, 2000).

III. HIPÓTESIS.

Es posible encontrar en el Perú hongos filamentosos que tengan la capacidad de segregar celulasas extracelulares con buena actividad celulolítica.

IV. OBJETIVOS

- Evaluar la actividad celulolítica en cepas fúngicas nativas provenientes de los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín, Huánuco.
- Seleccionar e identificar las mejores cepas que presenten mayor cantidad de enzimas celulolíticas extracelulares.

V. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS:

Reactivamos 289 cepas fúngicas aisladas de hojarascas en el año 2003 en cinco lugares de cuatro departamentos: Huarochirí (50), Satipo (82), Huancayo (59), Cajamarca (68) y Tingo María (30) preservados en el laboratorio de Micología aplicada. Se agregó a cada cepa 170 micro-litros (aproximadamente) de medio mínimo mineral czapeck sin glucosa, luego se adicionó una tira de papel filtro y se incubó por 5 días. Al observar crecimiento micelial sobre el papel, se hizo un repique en APD fresco y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta su utilización (Vilches, 2002).

5.2 EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO CELULASA

Las cepas fueron sembradas por puntura en placas de agar mínimo mineral czapeck empleando como fuente de carbono Na-carboximetilcelulosa 0.1g/L, incubadas por cinco días. Al cabo de ese tiempo se agregó aproximadamente 10 mL de la solución colorante rojo congo a una concentración de 0.5 g/L, dejándose reposar por 10 minutos. Para la visualización de áreas de aclaramiento (hidrólisis enzimática), se hicieron tres lavados repetidos con solución de NaCl 40g/L, para la visualización (Hendricks *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 2006).

5.2.1 SELECCIÓN DE CEPAS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN RADIAL EN AGAR CZAPECK-CARBOXIMETILCELULOSA SÓDICA

La selección se realizó de acuerdo a las áreas de hidrólisis en tres etapas, para obtener valores precisos, disminuir errores de ensayo y los relacionados con la fisiología del hongo del hongo, las medidas fueron tomadas colocando un papel milimetrado debajo de la placa petri, se anotaron los valores diametrales de las dos circunferencias superpuestas, la circunferencia menor producida por el micelio y la circunferencia mayor por las enzimas extracelulares (Figura 12) y se aplicó la fórmula : $A = \pi (R^2 - r^2) \text{ mm}^2$.

Para ordenar, interpretar y tomar criterios de selección se empleó los programas Microsoft Excel 2010 y Minitab 16

(R= Radio enzimas extracelulares, r = Radio micelio) (Zhang *et al.*, 2006).

5.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Las mejores cepas fueron identificadas empleando la técnica del microcultivo y las claves del manual “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” (Barnett y Hunter, 1998).

5.4 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO CELULASA

5.4.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

Cada cepa seleccionada se sembró en un frasco de 450 mL con APD (50 mL pico de flauta) (Figura 20), se dejó incubar a temperatura de laboratorio por 8 días, luego a cada frasco se le agregó 50 mL (aproximadamente) de tween al 0,1% y se agitó para suspender los conidios hasta obtener una solución homogénea.

5.4.2 AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO.

Para obtener el inóculo con una concentración de 10^6 conidios/mL, se tomó 10 mL del homogenizado en un tubo de prueba, luego se contrapesó y centrifugó a 5000 RPM por 10 minutos; posteriormente se extrajo 5mL del sobrenadante y se reemplazó con un nuevo volumen de 5 mL del homogenizado, luego se volvió a suspender los 10 mL nuevos, se tomó una gota de este homogenizado y se determinó la concentración de conidios en una cámara Neubauer, este proceso se repitió, en promedio 2 veces, hasta lograr la concentración deseada Izarra *et al.* (2009).

5.4.3 INDUCCIÓN DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO CELULASA

Se sembró 1 mL del inóculo por triplicado en 9 ml de medio mínimo mineral caldo czapeck a pH 4.5, colocando como inductor del complejo enzimático al papel filtro Whatman N° 1, se incubó por 5 días, a temperatura de laboratorio en un agitador orbital Marca Gemmy VRN-480 a 180 RPM, obteniéndose el extracto crudo del complejo enzimático celulasa.

5.4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO EXTRACELULAR

Se elaboró una curva patrón de glucosa (20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$) para poder extrapolar la cantidad de glucosa que producen las cepas en estudio.

La determinación de actividad enzimática de cada cepa se desarrolló inicialmente en un matraz de 50mL adicionando 1mL de la muestra problema, 1 mL de buffer fosfato a pH 4,5 y una tira de papel filtro (1x6 cm) y se incubó a 50 $^{\circ}\text{C}$ / 1hora. Luego en una fiola de 25 ml se incorporó; 1mL del incubado, 1 mL del reactivo de Somogy y lo llevamos a 90 $^{\circ}\text{C}$ en baño maría por 20 minutos, se enfrió en agua corriente seguidamente agregamos 1 mL del reactivo de Nelson y se enrasó con agua destilada a 25mL para luego hacer la lectura en un espectrofotómetro de luz visible marca SpectrumSp-1105 a una densidad óptica de 540 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI) del extracto crudo, definida como la cantidad de enzima que libera una μmol de glucosa por minuto por mililitro de sobrenadante, bajo las condiciones del ensayo (Vilches, 2002).

VI. RESULTADOS

6.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS:

Después de un periodo de almacenamiento de aproximadamente 7 años (2003 - 2010), se reactivó 260 (90%) de cepas fúngicas de un total de 289 (100%), provenientes de los lugares de: Huarochirí (50), Satipo (82), Huancayo (59), Cajamarca (68) y Tingo María (30) y los porcentajes de reactivación fueron: 43 (86%), 78 (95%), 54 (92%), 58 (85%) y 27 (90%) respectivamente (Tabla 3). Todas fueron trabajadas en condiciones de laboratorio, presentando un crecimiento filamentosos característico sobre el papel filtro, obteniendo cepas puras en un periodo de 9 días promedio.

6.2 SELECCIÓN DE CEPAS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN RADIAL EN AGAR CZAPECK-CMC

6.2.1 PRIMERA ETAPA.

Las 260 cepas fueron evaluadas después de ser incubadas por 5 días a temperatura ambiente. Se halló los valores en área de hidrólisis; mínimo 0, máximo 15.6 y media $4.42 \times 10^2 \text{ mm}^2$. Para poder elegir la menor área de selección ver Tabla 4 ($5.6 \times 10^2 \text{ mm}^2$) se tomó como referencia la media aritmética, seleccionando 78 cepas (Tabla 5): 18 fueron de Huancayo; 4, Tingo María; 34, Satipo; 11, Cajamarca y 11 Huarochirí (Tabla 6). Se observó que la mayoría de las cepas no produjo área de hidrólisis, seguidas por las áreas de valor 3 y $4 \times 10^2 \text{ mm}^2$ (Figura 12).

6.2.2 SEGUNDA ETAPA:

Las 78 (100%) cepas seleccionadas en la primera etapa, se reevaluaron usando la misma metodología. Los valores fueron: mínimo 4.7, máximo 16.8 y media $8.74 \times 10^2 \text{ mm}^2$. Para poder elegir la menor área de selección ($8.74 \times 10^2 \text{ mm}^2$) se tomó de referencia la media aritmética ver tabla 4, seleccionando 29 cepas (Tabla 5): Huancayo 7 (24.14%), Tingo María 3 (10.34%), Satipo 16 (55.17%), Cajamarca 0 (0.0%) y Huarochirí 3 (10.34%). Se observó mayor frecuencia de cepas con áreas de valor 8,10 y $11 \times 10^2 \text{ mm}^2$ (Figura 13).

6.2.3 TERCERA ETAPA

Las 29 (100%) cepas provenientes de la segunda etapa fueron evaluadas por última vez siguiendo la misma metodología. Los valores fueron: mínimo 5.8, máximo 16.1 y media $9.39 \times 10^2 \text{ mm}^2$. Para poder elegir la menor área de selección ($9.5 \times 10^2 \text{ mm}^2$) se tomó de referencia la media aritmética ver tabla 4, seleccionando 12 cepas (Tabla 5), distribuidas de la siguiente manera: Huancayo 3 (25%), Tingo María 1 (8.33%), Satipo 6 (50%), Cajamarca 0 (0%) y Huarochirí 2 (16.67%). Se observó mayor frecuencia de cepas con áreas de valor 8, y $9 \times 10^2 \text{ mm}^2$ (Figura 14).

6.2.4 SELECCIÓN DE CEPAS FUNGICAS PRODUCTORAS DE CELULASAS EXTRACELULARES.

Las 12 cepas seleccionadas mostraron valores precisos en las tres etapas de selección estos se promediaron y ordenaron de mayor a menor, de donde se eligió a las 5 cepas que presentaron mayor área de hidrólisis promedio: SA - 726 ($14.9 \times 10^2 \text{ mm}^2$); SA - 683 ($14.4 \times 10^2 \text{ mm}^2$); HN - 566 ($12.7 \times 10^2 \text{ mm}^2$); SA - 668 ($12.5 \times 10^2 \text{ mm}^2$); SA – 651($12.0 \times 10^2 \text{ mm}^2$) (Tabla 7, Tabla 8).

6.3 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Se identificó morfológicamente las cinco cepas seleccionadas, de las cuales tres presentaron colonia centro amarillo claro y extremos blancos de aspecto veloso y elevada, al observar sus estructuras en microscopio se observó micelio hialino, conidióforos ramificados, fiálides alargadas con una ligera constricción en la parte terminal donde se genera los conidios, también hialinos. Las características coinciden con las del género *Paecilomyces sp.* (SA – 726; SA -668; SA – 651) (Figura 15, Figura 16, Figura 17).

La cuarta cepa presentó colonia rosada, ligeramente elevada, de crecimiento rápido pigmentando el medio de cultivo. Esta presentó micelio hialino, conidióforos, micro-conidios (amerosporas pudiendo ser ovoides), macro-conidios (hialofragmas, estructuras largas en forma de canoa con septos transversales) hialinos, estas características pertenecen al género *Fusarium sp.* (SA - 683) (Figura 18).

La quinta cepa presentó una colonia blanca, algodonosa, radiada con segmentos verdosos, su morfología al microscopio presenta conidióforos ordenados verticalmente con terminación globosas (El engrosamiento globoso es de forma claviforme), presenta fiálides en todo el ápice (superficie globosa), de donde se generan los fialosporas, las características pertenecen al género *Aspergillus*, (HN – 566) (Figura 19).

6.5 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO CELULASA

La actividad enzimática del extracto crudo de las cinco cepas seleccionadas fue evaluada por el método de Somogy – Nelson, donde se encontró los siguientes valores: SA 683 = 0.080, SA-726 = 0.048, SA-668 = 0.042, SA-651 = 0.042 y HN-566 = 0.048 UI (Tabla 9).

Tabla 3: Reactivación de cepas fúngicas según el lugar muestreado.

LUGAR	HUAROCHIRI		SATIPO		HUANCAYO		CAJAMARCA		TINGO MARIA		TOTAL	
	CEPAS	%	CEPAS	%	CEPAS	%	CEPAS	%	CEPAS	%	CEPAS	%
REACTIVADAS	43	86	78	95	54	92	58	85	27	90	260	90
NO REACTIVADAS	7	14	4	5	5	8	10	15	3	10	29	10
TOTAL	50	100	82	100	59	100	68	100	30	100	289	100

Tabla 4: Áreas de hidrólisis en carboximetilcelulosa producidas por los hongos en las tres etapas de evaluación semicuantitativa.

	AREA DE HIDRÓLISIS MENOR (10^2 mm^2)	AREA DE HIDRÓLISIS MAYOR (10^2 mm^2)	MINIMA AREA DE HIDRÓLISIS PARA SELECCIÓN (10^2 mm^2)
1 ^{ra} ETAPA	0	15.6	5.6
2 ^{da} ETAPA	4.7	16.8	8.7
3 ^{da} ETAPA	5.8	16.1	9.5

Tabla 5: Cepas fúngicas seleccionadas por lugar de muestreo en las tres etapas de evaluación semicuantitativa.

ETAPA	1 ^{ra} SELECCIÓN		2 ^{da} SELECCIÓN		3 ^{ra} SELECCIÓN	
MUESTREO	CEPAS SELECCIONADAS	%	CEPAS SELECCIONADAS	%	CEPAS SELECCIONADAS	%
HUANCAYO	18	23.1	7	24.1	3	25
TINGO MARIA	4	5.1	3	10.3	1	8.3
SATIPO	34	43.6	16	55.2	6	50
CAJAMARCA	11	14.1	0	0.0	0	0
HUAROCHIRI	11	14.1	3	10.3	2	16.7
TOTAL	78	100	29	100	12	100

Tabla 6: Total de cepas de hongos seleccionadas en las tres etapas de evaluación semicuantitativa.

SELECCIÓN	1 ^{ra}		2 ^{da}		3 ^{ra}	
	N ⁰ CEPAS	%	N ⁰ CEPAS	%	N ⁰ CEPAS	%
CEPAS SELECCIONADAS	78	30.9	29	37.1	12	41.3
CEPAS ELIMINADAS	174	69.1	49	62.8	17	58.6
CEPAS EVALUADAS	252	100	78	100.0	29	100

Tabla 7: Promedio de las cepas de hongos seleccionadas en la tercera etapa durante la evaluación semicuantitativa.

PROMEDIO DE AREAS					
N	CEPA	1RA	2DA	3RA	PROMEDIO
1	SA-726	15.6	15.1	14.1	14.9
2	SA-683	11.8	16.8	14.7	14.4
3	HN-566	11.4	14.1	12.5	12.7
4	SA-668	10.1	11.3	16.1	12.5
5	SA-651	11.0	13.1	11.8	12.0
6	HN-543	10.1	11.9	10.8	10.9
8	HN-563	10.6	12.4	9.5	10.8
7	SA-686	10.1	11.2	10.5	10.6
9	HR-912-1	9.3	12.5	9.9	10.6
10	HR-944R22	8.6	10.2	10.8	9.9
11	TM-41561	9.3	10.1	9.7	9.7
12	SA-635	8.9	10.1	9.5	9.5

Tabla 8: Las 5 mejores cepas de hongos productoras de celulasas en las 3 etapas evaluación semicuantitativa.

PROMEDIO DE AREAS (10^2 mm^2)					
N	CEPA	1 ^{ra}	2 ^{da}	3 ^{ra}	PROMEDIO
1	SA-726	15.6	15.1	14.1	14.9
2	SA-683	11.8	16.8	14.7	14.4
3	HN-566	11.4	14.1	12.5	12.7
4	SA-668	10.1	11.3	16.1	12.5
5	SA-651	11.0	13.1	11.8	12.0

Tabla 9: Evaluación de la actividad enzimática en UI de las cepas fúngicas por el método cuantitativo.

Nº	CODIGO	CONIDIOS 10 ⁶ /ml	ABSORBANCIA	GLUCOSA 10 ⁻³ mg/ml	A. E. (UI)
1	SA – 683	11.4	0.039	14.5	0.080
2	HN – 566	15.7	0.029	8.7	0.048
3	SA – 726	10.4	0.029	8.7	0.048
4	SA – 651	18.1	0.027	7.5	0.042
5	SA – 668	23.8	0.027	7.5	0.042

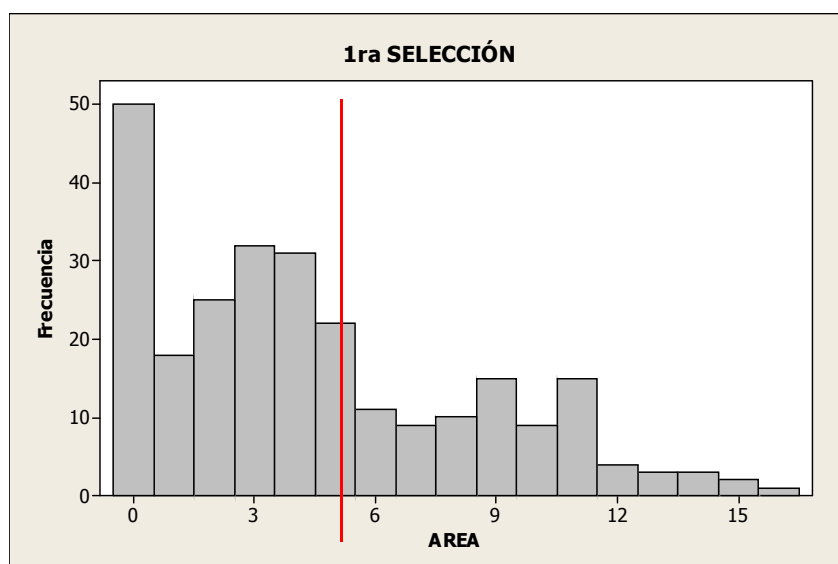


Figura 12: Comportamiento de las 260 cepas fúngicas en la primera selección con respecto a su frecuencia y su área (10^2 mm^2). La línea roja indica valor mínimo de selección ($5.6 \times 10^2 \text{ mm}^2$).

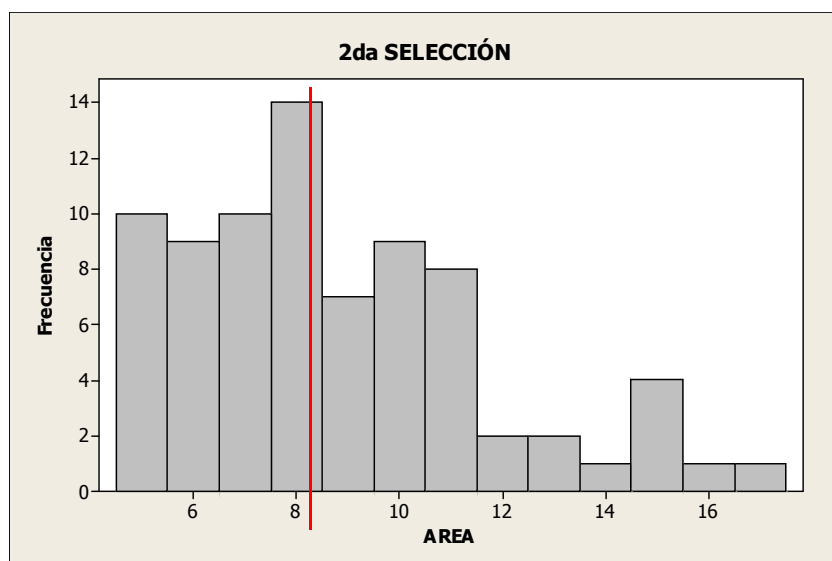


Figura 13: Comportamiento de las 78 cepas fúngicas en la segunda selección con respecto a su frecuencia y su área (10^2mm^2). La línea roja indica valor mínimo de selección ($8.7 \times 10^2 \text{ mm}^2$).

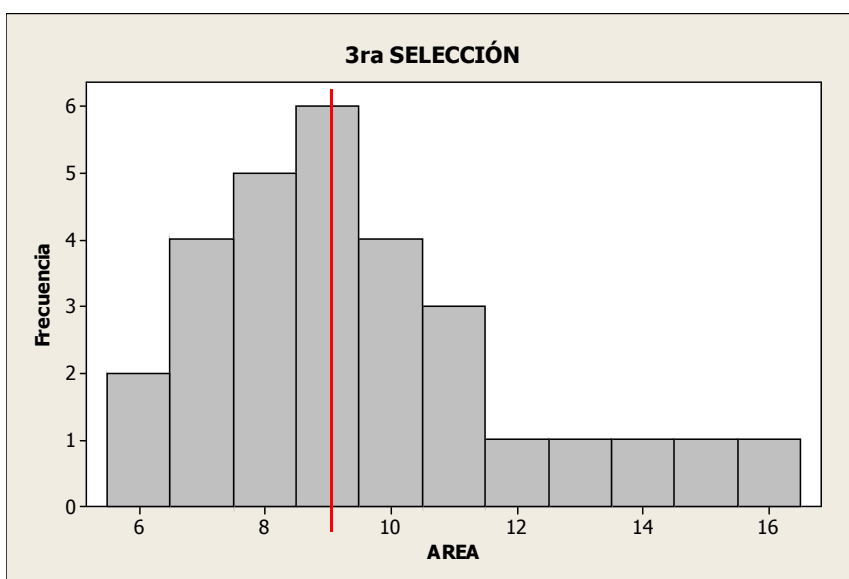
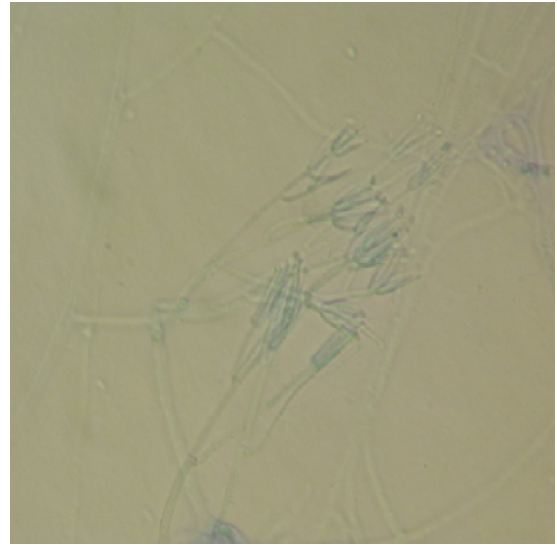


Figura 14: Comportamiento de las 29 cepas fúngicas en la tercera selección con respecto a su frecuencia y su área (10^2mm^2). La línea roja indica valor mínimo de selección ($9.5 \times 10^2 \text{ mm}^2$).

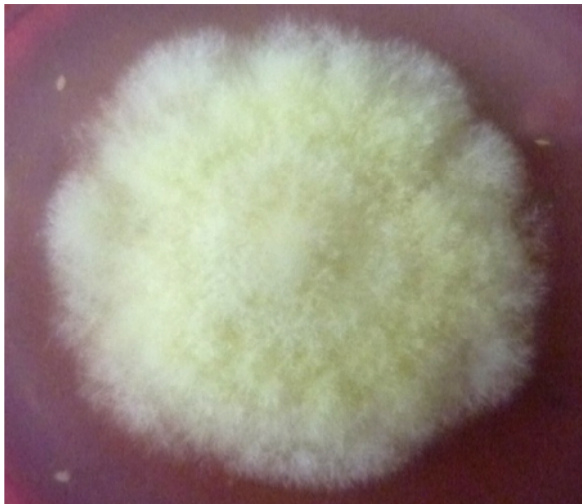


A) colonia (placa)

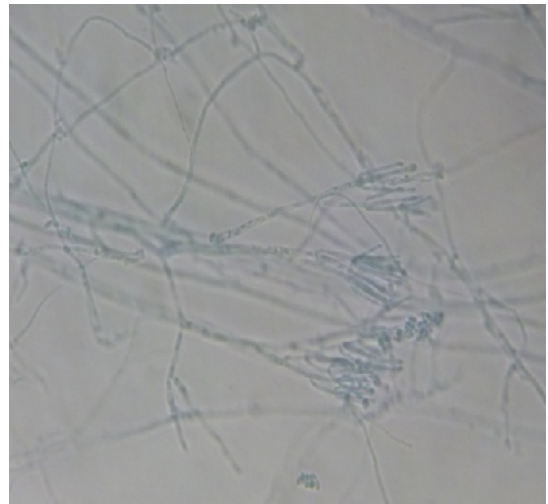


B) microcultivo (lamina)

Figura 15: *Paecilomyces sp cepa SA-726*: Características macroscópicas (A) y microscópicas (B)



(A) colonia (placa)

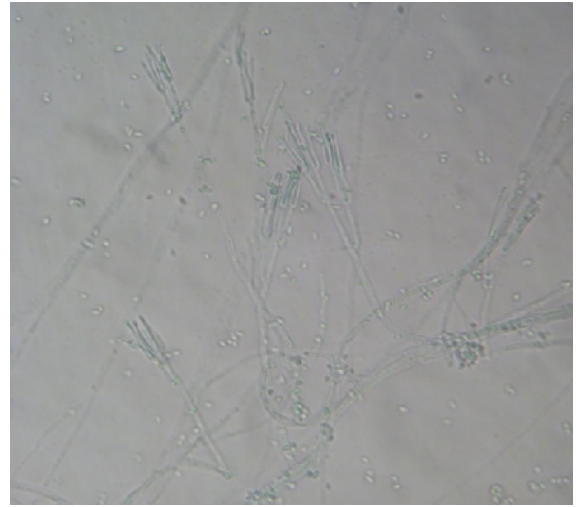


(B) microcultivo (lamina)

Figura 16: *Paecilomyces sp cepa SA-651* Características macroscópicas (A) y microscópicas (B)

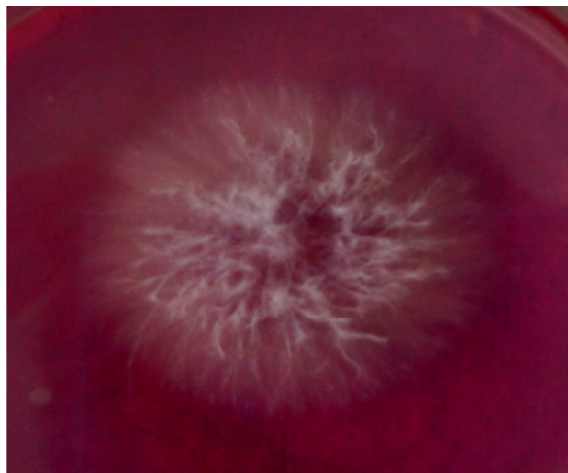


(A) colonia (placa)



(B) microcultivo (lamina)

Figura 17: *Paecilomyces sp* cepa SA-668 características macroscópicas (A) y microscópicas (B).

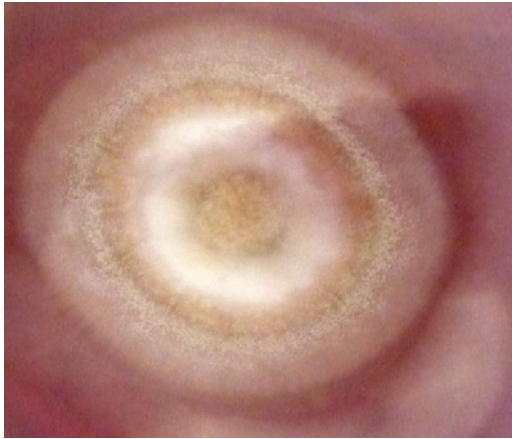


(A) colonia (placa)

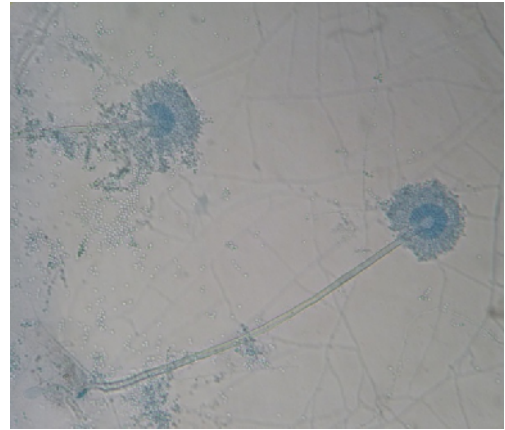


(B) microcultivo (lamina)

Figura 18: *Fusarium sp* cepa SA-683 Características macroscópicas (A) y microscópicas (B)



(A) colonia (placa)



(B) microcultivo (lamina)

Figura 19: *Aspergillus sp* cepa HN-566 características macroscópicas (A) y microscópicas (B).

VII. DISCUSIÓN

7.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS FUNGICAS

Ryan *et al*, (2000) elaboraron diversos criterios de acuerdo a las características de los hongos. Propusieron varios métodos para aquellos que presentaran esporas asexuales inmóviles: criopreservación en nitrógeno líquido a -196 °C, criopreservación -70 °C, bajo aceite, bajo agua, refrigeración domestica a -20°C ó 5°C, cultivos sub-continuos o liofilización. En cambio nosotros no empleamos ninguno de los métodos mencionados, sólo utilizamos APD, pH 4.5 y se mantuvo a temperatura de laboratorio por un periodo de 7 a 8 años. Nosotros logramos reactivar 90% (260) de las cepas fúngicas aisladas de hojarasca (Tabla 3), al parecer la facultad de formar esporas es el factor determinante en la viabilidad y la reactivación de cepas celulolíticas. Vilches (2002) encontró resultados parecidos a los nuestros al reactivar un porcentaje total de 88.5% (94) cepas de hongos celulolíticos aislados de Huaylas y Huaraz mantenidas en APD por un periodo de 12 años a temperatura de laboratorio.

La conservación en APD a temperatura de laboratorio proporcionó un 90% de reactivación, comparándose al método de conservación en agua destilada estéril, ya estudiada por otros autores como; Bueno y Gallardo (1998) quienes reactivaron un 100% de viabilidad en 26 cepas fúngicas de los géneros y especies siguientes: *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Fusarium sp*, *Fusarium moniliforme*, *Mucor griseocyanum*, *Syncephalastrum sp.*, *Trichoderma sp.*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii*, preservadas por un periodo de 2 años. Mac Ginnis *et al*, (1974) lograron reactivar un 93% de 147 cepas de hongos y actinomicetos después de un periodo de 5 años y Henao *et al*, (2006) comprobaron que la cepa de *Aspergillus niger* SMB14M3 mantenida por cuatro meses en agua destilada suplementada con NaCl al 0.85%, mayor eficiencia en comparación con otros 5 métodos. El periodo de almacenamiento en agua destilada

evaluado por los autores mencionados no es prolongado en comparación con el método que empleamos en este estudio, por lo que puede influir sobre el porcentaje de reactivación.

7.2 SELECCIÓN DE CEPAS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN RADIAL EN AGAR CZAPECK-CMC

Las 260 cepas fueron evaluadas semicuantitativamente en tres etapas por la técnica de difusión radial (Figura 11) como lo sugiere Zhang *et al.* 2006, con el fin de seleccionar las cepas que segreguen las enzimas al medio extracelular y conocer la precisión de los valores en las tres etapas de selección, debido a que la síntesis enzimática del microorganismo está influida por: la fisiología del microorganismo, concentración de los componentes del medio de cultivo, cantidad de inóculo, el pH, estabilidad de la enzima por el periodo largo de conservación, entre otros (Saddler, 1982).

Se observa en la primera etapa que el valor cero es de mayor frecuencia indicando que la mayor cantidad de hongos no segregan las enzima al medio extracelular, los valores de 3 y $4 \times 10^2 \text{ mm}^2$ fueron la segunda frecuencia elevada esto nos indicó que la mayor cantidad de cepas presentan enzimas extracelulares con actividad enzimática baja o de pobre síntesis (Figura 12), en la segunda y tercera etapa se observó que los valores de mayor frecuencia se encontraron entre 8, 9, 10 y $11 \times 10^2 \text{ mm}^2$ lo que indicó una actividad enzimática media a buena (Figura 13, Figura 14). Los resultados coinciden con lo mencionado por Saddler, 1982 al decir que numerosos microorganismos pueden degradar celulosa soluble, como la Na-carboximetilcelulosa, pero sólo unos pocos pueden producir niveles altos de celulasas extracelular.

En cuanto al estudio de los valores del área de aclaramiento producida por la actividad enzimática, Sazci *et al.*, (1986) trabajando con una metodología similar encontraron diámetros de 3.7cm en 7 cepas fúngicas de *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Neurospora*,

Aspergillus y *Penicillium*; Gaitan y Perez (2007) también hallaron valores en el aislamiento y evaluación de 8 cepas de bacterias provenientes de compost, con valores bajos de aclaramiento 0.2, 0.3, 0.35 mm, comparando nuestros resultados, el área mayor promedio en las 3 etapas fue de $14.9 \times 10^2 \text{mm}^2 = 1.5 \text{cm}^2 =$ diámetro mayor 4.7 cm y diámetro menor 1.8 cm (Figura 11), estos resultados son mayores a los autores mencionados pero se acercan a los encontrados por Lu *et al.*, (2005) quienes hallaron midieron zonas de aclaramiento de diámetros entre 2.55 y 6.40 cm entre los géneros de *Bacillus*, *Halobacillus*, *Aeromicrobium*, *Brevibacterium* y otros. Se debe considerar que los valores mostrados en este trabajo son promedio de tres repeticiones y los diferentes factores que afectan el crecimiento del microorganismo (Tabla 7), seleccionando las cepas que presentaron áreas de hidrolisis (Figura 11).

Para la selección final se tomó en cuenta la mayor área de hidrolisis promedio en las tres etapas, las cepas presentan los valores más elevados y precisos de la evaluación en general, con este criterio seleccionamos a 5 cepas: SA-651: 12.0; SA-668: 12.5; HN-566: 12.7; SA-683: 14.4; SA-726: $14.9 \times 10^2 \text{mm}^2$ (Tabla 8). Resultados parecidos mostró Vilches, (2002) al seleccionar 3 cepas de los géneros *Chrysosporium* y *Fusarium* de un total de 104 cepas nativas de Huaylas y Huaraz, Cruz *et al.*(2009) seleccionó 5, entre los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Streptomyces*, de 46 microorganismos entre bacterias, hongos y actinomicetos, Jalil y Omar(1998) seleccionaron 10 de 16 hongos, Urbay *et al.*(2005) seleccionaron 2 cepas, *Penicillium* sp. UC10 y *Trichoderma* sp. UC3, de 17 cepas de hongos por último Mikan y castellanos (2004) seleccionaron 5 de 65 aislados, los autores mencionados emplearon técnicas de selección diferentes y la cantidad de cepas evaluadas fue inferior a la nuestra.

7.3 CEPAS FÚNGICAS SELECCIONADAS

El género identificado como *Aspergillus sp* ha sido seleccionado por otros autores como Cruz *et al.* (2009) y Urbay *et al.* (2005), quienes demostraron que puede presentar buena actividad celulolítica en pruebas cualitativas y cuantitativas (endoglucanasa). El género *Fusarium sp* reportado también por presentar cepas potenciales para la degradación de residuos lignocelulósicos, presentando actividad exoglucanasa (Vilches, 2002; Li *et al.*, 2008). Por último el género *Paecilomyces* seleccionado en este trabajo presenta una buena actividad celulolítica en comparación a Rautela y Cowling, (1966) que evaluaron la capacidad celulítica de este género junto a otros de manera cualitativa y presentó baja actividad.

7.4 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO CELULASA.

La actividad enzimática en los hongos seleccionados se midió por el método de Somogy-Nelson, donde obtuvimos los siguientes valores: *Fusarium sp* SA 683: 0.080 UI/mL, *Paecilomyces sp* SA 726: 0.048 UI/mL; *Aspergillus sp* HN 566: 0.048 UI/mL, *Paecilomyces sp* SA 668: 0.042 UI/mL y *Paecilomyces sp* SA 651: 0.042 UI/mL (Tabla 9). Los resultados obtenidos son menores en comparación a los de Vilches, (2002) quien encontró tres cepas: HU 216 *Chrysosporium sp*, HU 218 D *Fusarium sp* y HU 251 *Fusarium sp* con actividades de 0.120 UI/ml, 0.137 UI/ml y 0.112 UI/ml respectivamente, Así mismo, Urbay *et al.* (2005) mostraron valores de 1,21 y 0,18 UI/mg en cepas del género *Penicillium* (UC10) y *Trichoderma* (UC3). Morales (2006) halló un valor máximo de 1,024 U/mg de actividad enzimática relativa en las cuatro cepas nativas de Costa Rica. La diferencia de estos valores encontrados en este trabajo puede estar explicada en la relación que existe entre las variables de ensayo, como los días de incubación, la concentración de inóculo, temperatura, entre otros, las cuales influyen en la producción de celulasas y la actividad enzimática. Está demostrado que existe variación en los

resultados por estas variables como el de Steiner *et al.*, (1994) quienes obtuvieron 0.22 UI/mL con una cepa de *Penicillium purpurogenum* al incubarlo en un medio de cultivo mejorado Madels y Weber con además aumentando la concentración de oxígeno por agitación constante. Izarra *et al.* (2009) encontró que la concentración de inóculo influye sobre la actividad enzimática de xilanasas (8,2 y 8,0 UI.xL-1xh-1) y es similar en la de celulasas (29,7 y 33,4 UI.xL-1xh-1) para concentraciones de 10^4 y 10^8 esporas/mililitro respectivamente en la evaluación del hongo *Aspergillus niger*. Abrha y Gashe (1991) demostraron la influencia de los componentes del medio de cultivo al variar las fuentes de carbono y nitrógeno para poder elevar la producción de celulasas de 1.4 a 4.5 veces; de la misma manera Ceroni y Correa (1988) evaluaron dos cepas *Penicillium implicatum* y *Penicillium spinulosum* donde encontraron 0.462 UI/mL y 0.625 UI/mL respectivamente, al suplementar el medio de cultivo con vitaminas, surfactante y lactosa, Ali *et al.*, (1991) compararon *Aspergillus terreus* GTC826 quien produjo dos a tres veces más de beta-glucosidasas que *Trichoderma reesei* QM9414 para temperaturas de inducción de 40°C y 28°C respectivamente. Como se puede observar la actividad enzimática es influenciada por los factores anteriormente mencionados lo que justifica hacer una optimización de parámetros en las cepas seleccionadas.

VIII. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron cinco cepas nativas de un total de 289 (100%) con capacidad de producir enzimas celulolíticas extracelulares.
- El departamento de Junín provincia de Satipo, es el lugar más adecuado para encontrar cepas fúngicas celulolíticas seguida de Huancayo.
- En una evaluación inicial, más del 50% de cepas presentaron baja actividad enzimática.
- El método de difusión radial en agar czapeck-Na-CMC es ideal para seleccionar hongos celulolíticos de manera cualitativa y semicuantitativa.
- Se identificó el género *Paecilomyces* que también puede presentar buena actividad enzimática, poco conocido en el estudio de los hongos celulolíticos.

VIII. RECOMENDACIONES.

- Se encontró un buen porcentaje de reactivación de hongos celulolíticos por conservación en APD a temperatura laboratorio, por lo que sería recomendable hacer una comparación con otro método.
- Este trabajo presenta una parte del potencial de las cepas fúngicas que tenemos en nuestro país, por lo que es necesario hacer más aislamientos en otros departamentos, y así tener un panorama completo del potencial de cepas nativas.
- Evaluar la técnica de difusión radial a diferentes temperaturas, para obtener resultados en menor tiempo y evaluar mayor cantidad de cepas.
- Es necesario optimizar el medio czapeck papel filtro para la inducción del complejo enzimático celulasa para las cepas nativas seleccionadas.
- El género *Paecilomyces* junto a otras cepas nativas no ha sido ampliamente estudiado por lo que es interesante continuar con su estudio.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABRHA B., GASHE B., 1992. Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. Journal. microbial. And biotech. Vol:8 p:164-166

ALI L., SAYED A., SARKER R., ALAM R., 1991. Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. J. microbiol. and biotech Vol:7 p: 62-66

BARNETT H., HUNTER B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. USA.

BUENO L., GALLARDO R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. Revista Iberoamericana de micología vol. 15: 166-168.

CASTILLO, M., GUTIERREZ M., LINDEN J and TENGERTY R..1994. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. Biotechnology Letters. Vol: 16, p: 967-972.

CHACON O., WALISZEWSKI., 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y ciencia. Vol: 21 (42) p 111-120.

CERONI A., GUTIERREZ CORREA., 1988. Production de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. Boletín de Lima. Vol :55 p: 13-20

CUERVO L., FOLCH J., QUIROZ R., 2009, Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. BioTecnología, Vol. 13 No. 3

CHINEDU S., OKOCHI I., SMITH A., OMIDIJI O., 2005. Isolation of cellulolytic microfungi involved in wood-waste decomposition: Prospects for enzymatic hydrolysis of cellulosic wastes. International journal of biochemical and health sciences. Vol.1 N°2

CRUZ N. CASTELLANOS D., ARGÜELLO H. 2009. Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá. Revista Colombiana de ciencias hortícolas - Vol. 3 – N°2 - pp. 237-249,

DEACON JW. 1990. Capítulo 5,6, Nutrición, Metabolismo. Introducción a la micología moderna. Buenos Aires: Ed. LIMUSA; p. 115, 135.

DUEÑAS, R., TENGEDY R. GUTIERREZ-CORREA M. 1995. Cellulase production by mixed fungi in solid substrate fermentation of bagasse. World Journal of Microbiology and Biotechnology Vol: 11, p: 333-337.

GARCIA O., VIDAL T., COLOM J., PASTOR F., DIAZ P., TORRES A. 2000. Influencia de la aplicación de celulasas en la fabricación de papel a partir de fibras de eucalipto. Congreso iberoamericano de celulosa y papel.

GAITAN D., PEREZ L. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. P: 114.

GHOSE T., 1987, Measurement of cellulose activities, pure and applied chemistry, Vol 59, NO 2, pp 257-268

GOLOVLOEV E., SRIABIN G. 1984. Enriquecimiento del forraje vegetal por proteína microbiana. Instituto de bioquímica y fisiología de microorganismos de la A.C. de la URRS. Editorial "Ciencia", Moscú, pp.

HENDRICKS C., DOYLE J., HUGLEY B. 1995. A New Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in Soil. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 61, No. 5 p. 2016–2019

HENAO I., CORREA M., MARIN G. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad Enzimática amilolítica. *Red de revistas científicas de américa latina y el caribe*. vol. 11, N°002 pp. 51-60.

HERNÁNDEZ A., GARCÍA E., RODRIGUEZ A., 1999 Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Journal of the Mexican Chemical Society*, Vol:43. N°.3-4.

HOWARD R. MASKO O. ABOTSI. 2003. Enzyme of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase (CBHI.1) expressed as a heterologous protein from *Escherichia coli*. *African journal of Biotechnology*. Vol: 2. p: 296-300

IRWIN D., SHIN D., ZHANG S., BARR B., SAKON J., KARPLUS P., WILSON D. 1998. " Roles of the Catalytic Domain and Two Cellulose Binding Domains of *Thermomonospora fusca* E4. In: *Cellulose Hydrolysis* ".Department of Biochemistry, Molecular and Cell Biology, Cornell University, Ithaca, New York American Society for Microbiology.Vol. 180, No. 7 p. 1709–1714

IZARRA M, SANTAYANA M, VILLENA G., GUTIÉRREZ M. 2009. Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger* Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. *Rev. Colombiana de Biotecnología*: Vol XII. N°2 Pag.139-150

JALIL A. OMAR O. 1998. Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-kinabalupark, Sabah, Faculty of Life Sciences, Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC).Art.II

KASANA R., SALWAN D., DHAR H., DUTT S., GULATI A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using grams Iodine".Springer Science. Volume 57: Number 5 p 503-507

LADISCH M., LIN T., VOLOCH M., TSAO G. 1983. Process considerations in the enzymatic Hydrolysis of biomass. Enzyme Microbiology Technology, Vol. 5,

Lu W., Wang H., Yang S., Wang Z., Nie Y. 2005. "Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system" J. Gen. Appl. Microbiol., vol: 51, p: 353–360

MACARRON R. 1992. Purificación y caracterización de Endoglucanasa III De *Trichodenna Reesei* Qm9414. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Bioquímica Y Biología Molecular 1. Tesis doctoral.. Madrid – España. Pag. 106

Mc GINNIS M., PADHYE A., AJELLO L. 1974. Storage of Stock Cultures of Filamentous Fungi, Yeasts, and Some Aerobic Actinomycetes in Sterile Distilled Water. AppliedMicrobiology, Vol. 28, No. 2 p. 218-222

MARQUINA D., 1991, "Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos". Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de biología. Madrid – España Pag. 291

MEJIA T., HIDALGO M., BRIEBA L. ORTEGA J. 2007. " Purification, characterization and modular organization of a cellulose-binding protein, CBP105, a processive b-1,4-endoglucanase from *Cellulomonas flavigena*." Biotechnology Letters: V: 30, N° 4, p 681-687

MIKÁN VENEGAS JOSÉ F., CASTELLANOS SUÁREZ DIANA E. 2004. Screening para el aislamiento y caracterización microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosa y hemicelulosas. Revista Colombiana de Biotecnología, vol.-VI. pp 58-71

MUÑIZ, G., M. GUTIERREZ-CORREA and R.P. TENDERDY. 1993. Solid substrate fermentation of potato cellulosic residues with *Chaetomium cellulolyticum*. Agro-Food-Industry Hi-Tech, Vol: 4, p: 33-34.

MORALES H. 2006. Aislamiento, selección y evaluación de la actividad celulolítica de cuatro cepas de hongos nativos de Costa Rica. Tesis. Pag. 44

PATROUILLEAU R., LACOSTE C., YAPURA P., CASANOVAS M., 2007, Perspectivas de los biocombustibles en Argentina, con énfasis en el etanol de base celulósica, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

RAMÍREZ P., COHA J.2003 "Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento caracterización y determinación de la actividad celulolítica". Revista peruana de biología 10(1): 67-77

RAUTELA G.; COWLING E., 1966, Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. American society for microbiology, vol. 14 N: 6

RONCANCIO S. SUAREZ M. MONTOYA C. ARISTIZABAL G. 2006. Aislamiento de clones con actividad endo-B-1,4glucanasa a partir de un segmento de ADN de 13KB de *clostridium sp* ibun 22^a. Universitas scientiarum. Vol: 11. P: 29-40.

RYAN M., SMITH D., JEFFRIES P. 2000. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. World Journal of microbiology y biotechnology 16: 183-186.

SADDLER J. 1982 Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme system. EnzymeMicrob. Technol. Vol: 4, 414 – 418.

SAZCI A., RADFORF A., & ERENLER. 1986. Detection of cellulolytic fungi by using congored as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. Journal of Applied Bacteriology.Vol: 61.p: 559-562.

SINGH A.; HAYASHI K., 1995, Microbial Cellulase.Protein architecture, molecular properties and biosynthesis Adv.in Appl. Microbiolo.Vol: 40, p:1-44

Steiner J., Socha C., Eyzaguirre J. 1994. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. word J Microbiol. And biotech. Vol: 10,P: 280-284

TROYA, M. Y GARCÍA, J. (2000). Micosis de la madera. Tomo II. Cap. 31. En: G. Yacer, M. López, A. Trapero, y A. Bello, Patología Vegetal. Valencia, España.

URBAY P., GONZÁLEZ L., NAVARRO C., MANSO M., DÍAZ F. 2005. Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de Hyphomycetes nativos de la provincia de Villa Clara. IX Simposio de Sanidad Vegetal en la Agricultura Tropical, N° 3.

VILCHES L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de la provincia de Huaylas y Huaraz. Tesis Pag. 77

Zhang P., Himmel M., Mielenz J. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology advances. Vol: 24 pp: 452–481.

ANEXOS

ANEXO 1: FIGURAS



Figura 20: Crecimiento del hongo en papel filtro en la etapa de reactivación.

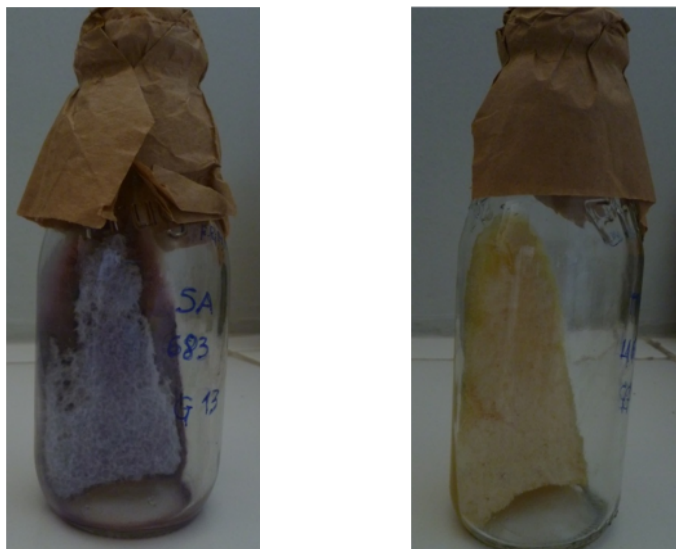


Figura 21: Crecimiento de *Fusarium sp.* SA – 683 (Izquierda) y *Paecilomyces sp* (SA – 726) (Derecha) en la preparación de inóculo.

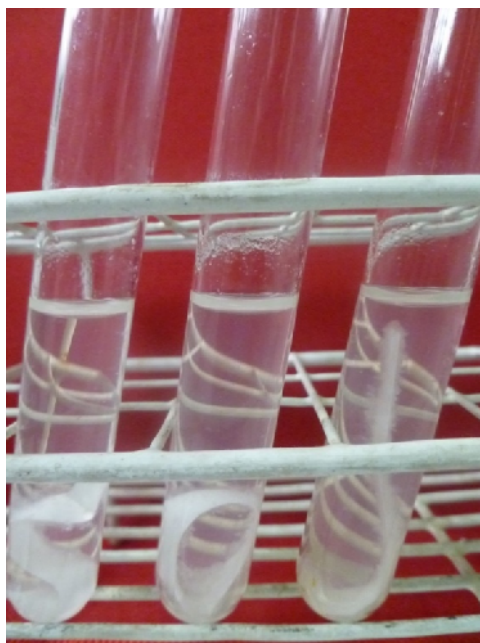


Figura 22: Crecimiento fúngico después de 5 días en incubación agitada, en czapeck-CMC.

ANEXO 2: Ficha de absorbancia y actividad enzimática

RESULTADOS EN ABSORBANCIA DE LAS CEPAS EVALUADAS

Nº	CODIG	ABSORBANC	ABSORBANCIA PROM	GLUCOSA PRODU	ACTIVIDAD ENZIMA
1					
2					
3					
4					
5					

FICHA PARA EL CONTEO DE CONIDIOS

FECHA:

CEPA	
------	--

	1	2	3	4	5	X	x16
1							
2							
3							
4							
5							

Px16		
x25		
Tot al conidios /ml		

Observaciones:

CEPA	
------	--

	1	2	3	4	5	X	x16
1							
2							
3							
4							
5							

Px16		
x25		
Tot al conidios /ml		

Observaciones:

FICHA PARA EL METODO DE DIFUSION RADIAL EN AGAR CZAPECK-CMC

FECHA DE SIEMBRA	
FECHA DE REVELADO	
DIAS DE INCUBACION	

N	CEPA	D. MICEL	R. D. MICEL	D. TOTAL	R. D. TOTAL	AREA X10 ² mm ²	OBS.
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
7							
8							
9							
10							

ANEXO 3: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Agar czapeck-CMC	
Nitrato de sodio	1.0 g
Fosfato dipotásico	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.25 g
Cloruro de potasio	0.25 g
Sulfato férrico	5×10^{-3} g
Carboximetil celulosa (CMC)	2.5 g
Agar-agar	17.0 g
H ₂ O	1 000 ml
pH	4.5

Solución rojo de congo	
Rojo de congo	0.5 g
H ₂ O	1 000 ml

Solución cloruro de sodio	
ClNa	0.5 g
H ₂ O	1 000 ml

Agar Papa Dextrosa	
Agar agar	15 g
Papa	300 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1000 ml
pH	4.5

Buffer acetato 0.05 M	
NaCl	5.84 g
Buffer acetato	4.1 g
Agua destilada	1000 ml
pH	4.5

Reactivo de Somogy	
Reactivo A	
Na ₂ CO ₃ (sin agua)	25 g
C ₄ H ₄ O ₆ KNa (Tartrato 4 hidratado de sodio potasio)	25 g
NaHCO ₃	20 g
Na ₂ SO ₄ (sin agua)	200 g
H ₂ O	1000 ml
Reactivo B	
Cu ₂ SO ₄	15 g
H ₂ SO ₄	0.4 ml
H ₂ O	100 ml

Reactivo de Nelson	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O (Molibdato de amonio)	25 g
H ₂ O	450 ml
H ₂ SO ₄	21 ml
Na ₂ HASO ₄ ·7H ₂ O	3 g
H ₂ O	25 ml
mantener a 37 °C	